

DOCKET NO.: 217677US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Masako IZUI et al.
SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION
FILED: HERewith
INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/04348
INTERNATIONAL FILING DATE: June 30, 2000
FOR: DNA ENCODING SUCROSE PTS ENZYME II

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:


COUNTRY
Japan

APPLICATION NO
11-189512

DAY/MONTH/YEAR
02 July 1999

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP00/04348. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

30.06.00

JP00/4348
日本国特許庁PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 14 JUL 2000

WIPO PCT

4
10/019282

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 7月 2日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第189512号

出願人
Applicant(s):

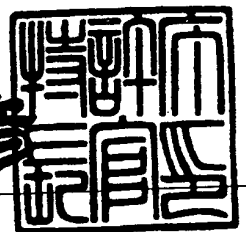
味の素株式会社

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月31日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



【書類名】 特許願

【整理番号】 P-6376

【提出日】 平成11年 7月 2日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 シュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNA

【請求項の数】 3

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 泉井 正子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 杉本 雅一

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 中松 亘

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 倉橋 修

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 シュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNA

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記(A)又は(B)に示すタンパク質。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質。

【請求項2】 下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質。

【請求項3】 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項2記載のDNA。

(a) 配列表の配列番号1に示す塩基配列のうち、塩基番号3779~5761からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列表の配列番号1に示す塩基配列のうち、塩基番号3779~5761からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、コリネ型細菌のシュークロースの細胞内への取り込みに関与するタンパク質であるシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAに関する。

【0002】

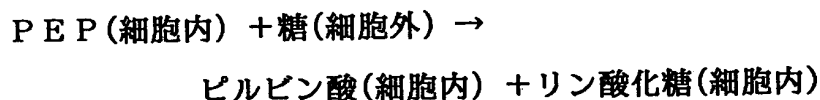
【従来の技術】

細菌は、多くの炭素源を資化することができるが、それらの細胞膜透過には種々の特異的な透過系が存在している。また、大抵の細菌は、限られた栄養下で生育するために環境の変化に応答することができる。環境をモニターして種々の炭素源の中から選択するために、細胞は検出器を備えている。このような、糖の透過系及び検出器として、PTS (phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system、又はphosphoenolpyruvate-sugar transport system) がある (以下、PTSについては、Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology, second edition, ASM (American Society for Microbiology) press 参照)。

【0003】

PTSは、種々の糖 (PTS糖) の透過とリン酸化、これらの炭素源に向かう運動、及び多くの代謝経路の調節に関与している。PTSは、次の反応を触媒する。尚、PEPは、ホスホエノールビルビン酸を表す。

【0004】



【0005】

PTSは、細胞内のホスホエノールビルビン酸 (以下、「PEP」ともいう。) にリン酸基を細胞外の糖に転移してリン酸化糖とビルビン酸を生成する反応を触媒する。糖のリン酸化は、糖の細胞膜透過とリンクしており、これらのプロセスに必要なエネルギーは、解糖系の中間体であるPEPにより供給される。

【0006】

エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) 及びサルモネラ・チフィムリウム (Salmonella typhimurium) では、PTSを構成するタンパク質は、以下の反応を触媒する。

- (1) $\text{PEP} + \text{EI} \rightarrow \text{P-EI} + \text{ビルビン酸}$
- (2) $\text{P-EI} + \text{Hpr} \rightarrow \text{P-Hpr} + \text{EI}$
- (3) $\text{P-Hpr} + \text{EIIA} \rightarrow \text{P-EIIA} + \text{Hpr}$
- (4) $\text{P-EIIA} + \text{EIIB} \rightarrow \text{P-EIIB} + \text{EIIA}$

(5) $P-EIIB + \text{糖 (細胞外)} + EIIB + \text{糖-P (細胞内)}$

【0007】

上記反応にあずかるタンパク質のうち、EI (エンザイムI) 及びHPr (ヒスチジンタンパク質) は、すべてのPTS糖のリン酸化に関与する可溶性の細胞質タンパク質であり、普遍的PTSタンパク質 (general PTS protein) と呼ばれている。

【0008】

一方、EII (エンザイムII) はPTS糖に特異的であり、糖によっていくつかのドメイン又はタンパク質からなっている。例えば、マンニトールではEIIはA、B及びCの3つのドメインからなる膜結合タンパク質であり、グルコースやシュークロースではEIIは膜結合タンパク質であるIIB及びIICと、可溶性タンパク質であるIIAからなる。いずれの場合でも、PEPから糖へのリン酸基の転移は、EI、HPr、EIIA及びEIIBを介して行われる。EIIの膜内部分であるEIIICドメインは、転移チャネルを形成しており、おそらく基質の特異的結合部位であると考えられている。

【0009】

EIIの第三のタイプは、マンノースPTSにみられるものであり、A、Bの両ドメインは単一の可溶性ポリペプチド中で融合しており、二つの膜内タンパク質 (IIC及びIID) がマンノースの透過に関与している。

【0010】

エシェリヒア・コリ及びサルモネラ・チフィムリウムでは、EIをコードする遺伝子 (ptsI) はクローニング、配列決定がなされている (Saffen, E.W. et al., J. Biol. Chem., 262, 16241-16253 (1987)、De Reuse, H. and Danchin, A., J. Bacteriol., 170, 3827-3837 (1988))。また、EIIについても、いくつかの糖ではクローニングされている (Saffen, E.W. et al., J. Biol. Chem., 262, 16241-16253 (1987)、Erni, B. and Zanolari, B., J. Biol. Chem., 261, 16398-16403 (1986)、Nelson, S.O. et al., EMBO J., 3, 1587-1593 (1984))。

【0011】

尚、糖の種類によっては、その細胞内への取込み系として、PEPを必要とし

ない非PTS (non-PTS) が存在するものも知られている。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように、糖の細胞内への取り込みに関する研究が進んでいるが、産業上
有用なコリネ型細菌ではPTSに関する研究は進んでいない。本発明は、コリネ
型細菌のシュークロースPTSを構成するタンパク質をコードする遺伝子を提供
することを課題とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本出願人は、コリネ型細菌のシュクラゼ（インベルターゼ）をコードする遺
伝子を含むDNA断片を単離してその構造を決定し、さらに、増幅したシュクラ
ゼ遺伝子を保持するコリネ型細菌を用いたアミノ酸又は核酸の製造法を開発し
ている（特開平5-244958号、特開平8-196280号）。前記DNA断片のうち、約6k
bのSmaI断片及びそれに含まれるシュクラゼ遺伝子上流約1 kbの領域には、
4つのオープン・リーディング・フレーム（ORF-F1、ORF-F2、ORF-F3及びORF-F4
）が存在している。そのうち、ORF-F2がシュクラゼをコードしていると推定さ
れている。

【0014】

しかし、本発明者らは、他のシュクラゼ遺伝子との比較から、前記ORF-F2は
シュクラゼ遺伝子全長を含んでいないのではないかと考えた。すなわち、既知
のシュクラゼ遺伝子から推定されるシュクラゼのアミノ酸残基数は466～
511である（Gunaseakren, P., J. Bacteriol. 172(12) 6727-35(1990)）のに
対し、ORF-F2がコードし得るアミノ酸配列は424アミノ酸残基と比較的短かっ
た。そこで、ORF-F2の下流の配列を再クローニングし、その塩基配列を決定した
。そして、前記のシュクラゼ遺伝子を含むDNA断片は、2つの独立したクロー
ン化断片が連結されたものであったことが明らかとなり、新たにシュクラゼ
遺伝子下流にシュークロースPTSエンザイムIIをコードする遺伝子が存在す
ることを見出し、本発明に至った。

【0015】

すなわち本発明は、下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質である。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質。

【0016】

本発明はまた、下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする DNA を提供する。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質。

前記 DNA としては、下記 (a) 又は (b) に示す DNA が挙げられる。

(a) 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列のうち、塩基番号 3779~5761 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列のうち、塩基番号 3779~5761 からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【0017】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の DNA は、後記実施例においては、プレバクテリウム・ラクトファーマメンタムの染色体 DNA のシュクラゼ遺伝子の下流領域を PCR (ポリメラーゼ・チェーン・リアクション) によって増幅することによって取得されたものである。

【0018】

染色体 DNA 上の既知の領域に隣接する領域は、その領域を含む DNA フラグメントにカセットを連結し、既知の領域に対応するプライマーと、カセットに対応するプライマーを用いた PCR によって増幅することができる。その際、カセ

ットの5'末端を脱リン酸化しておく、染色体DNAフラグメントとカセットの5'末端との接続部位にはニックが生じる。そのため、カセットプライマーから始まるDNA合成はこの接続部位で停止し、合成プライマーから合成されたDNAのみがカセットプライマーからの合成の鋳型となり、相補鎖が形成される。その結果、特異的な増幅が可能となる (Cassette-ligation mediated PCR法 (Molecular and Cellular Probes, 6, 467-475))。この方法を利用したキットが市販されており (宝酒造(株)製TAKARA LA PCRTM in vitro Cloning Kit)、本発明のDNAの取得に利用することができる。

【0019】

本発明のDNAは、本発明のDNA及びその隣接領域の塩基配列が明らかとなったので、同塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いて、コリネ型細菌染色体DNAを鋳型とするPCRによって、直接増幅することができる。そのようなプライマーとしては、配列番号10及び配列番号21に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。また、本発明のDNAは、その塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブに用いるハイブリダイゼーションにより、染色体DNAライブラリーから単離することもできる。コリネ型細菌の染色体DNAは、例えばSaitoらの方法 (Biochim. Biophys. Acta, 72, 619-629 (1963)) に記載) あるいはK. S. Kirbyの方法 (Biochem. J., 64, 405, (1956)) 等の方法により取得することができる。

【0020】

その他、染色体DNAの調製、染色体DNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載されている。

【0021】

本発明のDNAのクローニングや染色体DNAライブラリーの作製等に使用さ

れるプラスミドとしては、エシェリア属細菌等の微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228、pMW119、pUC19等が挙げられる。

【0022】

上記のようにして取得される本発明のDNAを含むDNA断片の塩基配列の一例を、配列表の配列番号1に示す。同塩基配列中、塩基番号3779～5761からなる領域が、本発明のタンパク質であるシュークロースPTSエンザイムIIをコードしている。尚、配列番号1に示す塩基配列中、塩基番号342～1505、及び塩基番号2338～3609が、特開平8-196280号に記載のシュクラゼ遺伝子を含むDNA断片中のORF-F1、ORF-F2に各々相当する。また、配列番号1に示す塩基配列と、特開平8-196280号に記載の塩基配列とを比較すると、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号1～3687の領域が、特開平8-196280号に記載の塩基配列と一致した。このことから、前記シュクラゼ遺伝子を含むDNA断片は、2つの独立したクローン化断片からなることが明らかとなった。

【0023】

本発明のDNAは、コードされるシュークロースPTSエンザイムIIのシュークロースに結合する活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むシュークロースPTSエンザイムIIをコードするものであってもよい。ここで、「複数」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なる。それは、イソロイシンとバリンのように、アミノ酸によっては、類縁性の高いアミノ酸が存在し、そのようなアミノ酸の違いが、蛋白質の立体構造に大きな影響を与えないことに由来する。従って、シュークロースPTSエンザイムIIを構成するアミノ酸配列全体に対し、70～80%以上、好ましくは90～95%以上の相同性を有し、シュークロースに結合する活性を有するものであってもよい。具体的には、前記「複数」は、2～180個、好ましくは、2～60個、より好ましくは2～5個である。

【0024】

上記のようなシュークロースPTSエンザイムIIと実質的に同一のタンパク質

をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、シュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【0025】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、シュークロースPTSエンザイムIIを保持する微生物の個体差、種や属の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) も含まれる。

【0026】

変異を有するシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号3779~5761からなる塩基配列を有するDNA又は同塩基配列を有するDNAからPCR法等により調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、シュークロースに結合する活性を有するシュークロースPTSエンザイムIIを有するタンパク質をコードするDNAを単離することによって、シュークロースPTSエンザイムIIと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0027】

このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものも含まれるが、それらについては、市販の発現ベクターにつなぎ発現産物の大きさを調べることによって、容易に取り除くことができる。

【0028】

本発明のタンパク質は、上記本発明のDNAによってコードされるタンパク質であり、配列番号2に示すアミノ酸配列を有する。本発明のタンパク質は、シュークロースに結合する活性を有する限り、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有するものであってよい。

【0029】

本発明のDNAは、コリネ型細菌のシュークロース取り込み能の改善等に利用することができる。また、PTSは、糖の細胞内への取り込みにPEPを消費するため、生合成系の上流にPEPが位置するアミノ酸等の合成にとっては不利であると考えられる。そこで、シュークロースPTSを破壊し、PEPを必要としない取り込み系によりシュークロースを取り込むことができれば、シュークロースの取り込み速度やアミノ酸等の生産性の点からは有利であると考えられる。尚、コリネ型細菌では、シュークロースの非PTSは知られていないが、例えばシュクラゼを細胞外に作用させれば、グルコース及びフルクトースを非PTSで取り込むことができる。

【0030】

また、本発明のDNAを改変し、機能が強化又は低減されたシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNA、又は他の遺伝子由来のプロモーター等の発現制御配列に連結した本発明のDNAを、コリネ型細菌に導入することによって、シュークロース取り込み能が強化又は低減されたコリネ型細菌を創製することができる。具体的には、機能が強化されたシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAは、コリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクター上又は染色体DNA上に保持される。また、機能が低減されたシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAは、相同組換えを利用した遺伝子置換によ

って染色体DNA上に保持される。あるいは、温度感受性複製制御領域を含むプラスミドを用いた遺伝子置換（特公平7-108228号参照）によって、低温ではシュークロースPTSが機能し、高温では機能しないコリネ型細菌を創製することもできる。

【0031】

本発明を応用可能なコリネ型細菌は、従来プレバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属に統合された細菌を含み（Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)）、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なプレバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

【0032】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・アルカノリティカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム（コリネバクテリウム・グルタミカム）

コリネバクテリウム・メラセコーラ

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス

コリネバクテリウム・ハーキュリス

プレバクテリウム・ディバリカタム（コリネバクテリウム・グルタミカム）

プレバクテリウム・フラバム（コリネバクテリウム・グルタミカム）

プレバクテリウム・インマリオフィラム

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム（コリネバクテリウム・グルタミカム）

プレバクテリウム・ロゼウム

プレバクテリウム・サッカロリティカム

プレバクテリウム・チオゲニタリス

プレバクテリウム・アンモニアゲネス（コリネバクテリウム・アンモニアゲ

ネス)

ブレバクテリウム・アルバム

ブレバクテリウム・セリヌム

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

【0033】

コリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターとしては、pAM330 (特開昭58-67699号公報参照)、pHM1519 (特開昭58-77895号公報参照) 等が挙げられる。また、これらのベクターからコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力を持つDNA断片を取り出し、エシェリヒア・コリ用のベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の受託番号をカッコ内に示した。これらの内、pHSC4は温度感受性複製制御領域を含む。

【0034】

PAJ655 エシェリヒア・コリアJ11882 (FERM BP-136)

コリネバクテリウム・ゲルムミクスSR8201 (ATCC39135)

PAJ1844 エシェリヒア・コリアJ11883 (FERM BP-137)

コリネバクテリウム・ゲルムミクスSR8202 (ATCC39136)

PAJ611 エシェリヒア・コリアJ11884 (FERM BP-138)

PAJ3148 コリネバクテリウム・ゲルムミクスSR8203 (ATCC39137)

PAJ440 バチルス・スブチリスAJ11901 (FERM BP-140)

pHC4 エシェリヒア・コリアJ12617 (FERM BP-3532)

pHSC4 エシェリヒア・コリアJ12571 (FERM BP-3524)

【0035】

本発明のDNAを含む組換えベクターをコリネ型細菌に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリ K-12 について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53,

159 (1970)) があり、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法 (Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153 (1977)) がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法 (Chang, S. and Choen, S.N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978))、及び電気パルス法 (特開平2-207791号公報参照) も応用できる。

【0036】

【実施例】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0037】

【実施例1】 シュークロースPTSエンザイムIIをコードする遺伝子の単離
<1> プレバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ12036 (FERM BP-734) の染色体DNAのサザンハイブリダイゼーションによる解析

プレバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ12036を、M-CM2S培地 (シュークロース5g/L、ポリペプトン10g/L、酵母エキス(Yeast Extract)10g/L、NaCl 5g/L、DL-メチオニン0.1g/L) 4ml中で一晩培養し、菌体を回収した。得られた菌体よりBacterial Geneomic DNA Purificationキット (Advanced Genetic Technologies Corp.社製) を用いて染色体DNAを抽出した。染色体DNAは、TE緩衝液 (組成: 10mMトリス-HCl (pH7.5)、1mM EDTA-2Na) 50 μ lで溶出した。

【0038】

上記のように抽出した染色体DNAについて、Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行った。染色体DNAは、ORF-F2のC末端側とORF-F3のN末端側の領域を切断しないBamHI、SmaIで別々に消化し、アガロース電気泳動に供した。プローブとして、pSSM30 (特開平8-196280号) 上

にクローニングした6.9kbのうちORF-F2のC末端側とORF-F3のN末端側の領域をカバーするようなBamHIで切り出される約3kbの断片（特開平8-196280、配列表の配列番号1649～4675のフラグメント）を用いた。

【0039】

ハイブリダイゼーションの結果、バンドが2本検出され、ORF-F2とORF-F3は染色体上では隣接しないことが明らかとなった。そこで、シュクラゼ遺伝子の下流の配列を再確認することとした。

【0040】

<2>シュクラゼ遺伝子の下流領域の配列の決定

シュクラゼ遺伝子の下流の領域の塩基配列の決定については、まず、下流領域をPCR法により増幅した。PCRは、宝酒造(株)製TAKARA LA PCRTM in vitro Cloning Kitを用いて行った。具体的には以下のようにして行った。

【0041】

染色体DNAを、前記キット付属のカセット（配列表配列番号3～8）と同じ切断末端を生じる制限酵素10種類（SpeI、EcoT14I、NheI、PstI、EcoT22I、BglII、BamHI、XhoI、SalI、AvaI）を用いて完全消化した。これらのフラグメントを鋳型

として、表1に示す合成プライマー1と、カセットプライマー1（配列番号19）を用いてPCRを行った。カセットの5'末端にはリン酸基が付加されていないので、染色体DNAフラグメントとカセットの5'末端との接続部位にはニックが生じる。そのため、カセットプライマーから始まるDNA合成はこの接続部位で停止し、合成プライマーから合成されたDNAのみがカセットプライマーからの合成の鋳型となり、相補鎖が形成される。

【0042】

次に上記で得られた増幅産物を鋳型として、合成プライマー2とカセットプライマー2（配列番号20）を用いてPCRを行った。その結果、鋳型として染色体DNAをEcoT14I、PstI、BglII、BamHI、XhoI、AvaIで切断したDNAを用いた場合に、フラグメントが増幅できた。BamHI消化したDNAフラグメントを鋳型として増幅された断片約1.8kbについて、塩基配列決定を行った。

【0043】

【表1】

表1 合成プライマーの塩基配列及びその位置

プライマー 番号	塩基配列	配列番号1における 位置 (塩基番号)
1	CGTCTTGGCAGGATTCAGCGAGCTG (配列番号9)	(3159~3183)
2	AGCTGGATTTCGGCCATGAATTCTA (配列番号10)	(3179~3203)
3	GATCTGTTCCGGTCCGCAATCACT (配列番号11)	(4189~4212)
4	CACTGGTGGAGATGTTCCCTCAGAT (配列番号12)	(4209~4233)
5	CATCTTCGCAACCGCATCCATGGCC (配列番号13)	(4801~4825)
6	CGCGCAGGGTGCAGCATGTTTGGC (配列番号14)	(4831~4854)
7	GGGCCTTGCAGGTGCTTCAGGTGTC (配列番号15)	(4888~4912)
8	CCGCTGTTCTTGGTATTACAGAGCC (配列番号16)	(4914~4938)
9	GCAGCGTCAGCGATGCCATGTTTGC (配列番号17)	(5322~5346)
10	GCTTGGCTCAGGTGTTGCGATCGTC (配列番号18)	(5356~5380)

【0044】

決定した配列を基に、合成プライマー3と4を合成した。上記と同様にして、合成プライマー3とカセットプライマー1の組み合わせ、及び合成プライマー4とカセットプライマー2の組み合わせで、フラグメントを順次PCRにより増幅した。その結果、染色体DNAをPstIまたはBamHIで切断したDNAを鋳型にした場合に、フラグメントが増幅できた。PstI消化したDNA断片を基に増幅したフラグメントについて塩基配列の決定を行った。

【0045】

決定した配列をもとに、合成プライマー5と6を合成した。合成プライマー5とカセットプライマー1、合成プライマー6とカセットプライマー2の組み合わせで、順次PCRを行ったところ、鋳型としてEcoT14消化染色体DNA及びPstI消化染

色体DNAを用いた場合に、増幅断片が確認できた。前者について塩基配列決定を行った。

【0046】

更に、合成プライマー7と8を合成し、上記と同様の操作を行ったところ、EcoT14消化染色体DNAを鋳型に用いたときに、増幅断片が確認できた。この増幅断片の塩基配列を決定した。

【0047】

上記配列を基に、プライマー9と10を合成し、上記と同様の操作を行ったところ、SpeI消化染色体DNAを鋳型に用いたときに、増幅断片が確認できた。この増幅断片の塩基配列を決定した。

【0048】

塩基配列の決定は、ABI社製のシーケンスキットを用いてプロトコルに従い反応させた後、蛍光標識法により増幅フラグメントの塩基配列を決定した。

以上の結果を、配列表の配列番号1に示す。同塩基配列中の塩基番号3684以降に、新規にORFが存在することが判明した。ORFは塩基番号3779~5761の1983bpとなり、決定した塩基配列を翻訳して得られる蛋白質は661アミノ酸であると推定された。同ORFについてGENBANK CDSデータベースにより相同性検索を行った。その結果、表2に示すように、前記ORFがコードし得るタンパク質は、シュークロースの取り込みに特異的な蛋白質であるシュークロースPTSエンザイムIIと高い相同性を示した。以下、前記ORFをptsII_{suc}遺伝子と呼ぶ。

【0049】

【表2】

表2 新規ORFの相同性検索の結果

細菌及び遺伝子名	相同性のある既知の蛋白質	相同性(%)
P. pentasaceus	scrA	EnzymeIIscr 48.8
B. subtilis	treP	trehalose specific enzyme IIBC 43.4
S. xylosus	scrA	EnzymeIIscr 52.2

S. mutans	scrA	EnzymeIIscr	45.4
S. typhimurium			
plasmid pUR400	scrA	EnzymeIIscr	37.6

【0050】

【実施例2】 シュークロースPTSエンザイムII遺伝子破壊株の作製
ptsIIsuc遺伝子が破壊されたプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムを作製した。まず、遺伝子破壊用のプラスミドを構築した(図1)。まず、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムAJ12036の染色体を鋳型に、前記プライマー2(配列番号10)及び以下に示す塩基配列を有するプライマー11(配列番号21)を用いてPCRで増幅したptsIIsuc遺伝子断片を、TAクローニングキット(I nvitrogen社製)を用いてクローニングし、同プラスミドをpCRS2とした。

【0051】

(プライマー11)

CGCTACTGCTGAACGAACATGTCC (配列番号1の塩基番号5947~5924に相当)

【0052】

pCRS2より、XbaI、SpeI消化により切り出した断片をpHSG399のXbaIサイトに接続し、p399S2を構築した。このプラスミドをHpaI、BamHI消化し、生じたフラグメント(配列番号1の塩基番号4385~4798に相当)を、SmaI、BamHI消化したpHSG299と連結し、プラスミドpdSBを構築した。次に、pdSBをBamHI消化し、プラスミドpBCT4をBamHI消化して切り出したコリネ型細菌で複製可能な温度感受性複製起点(特公平7-108228号参照)を接続し、プラスミドpdSBTを構築した。同プラスミドは、5'末端部及び3'末端部を欠失したptsIIsuc遺伝子を含んでいる。pdSBTは、コリネ型細菌中で、約10~32℃では自律複製できるが、約34℃以上では自律複製できない。

尚、pBCT4は、次のようにして構築した。特公平7-108228号に記載の温度感受性ベクターpHSC4を制限酵素BamHI及びKpnIで切断し、得られた温度感受性複製起点を含む約3kbのDNA断片を得た。得られたDNA断片の両末端をT4 DNAポリメラーゼにより平滑末端化した。このDNA断片にBamHIリンカーを接続し、これを再びBa

mHIで切断した後、同じくBamHIにて切断したpHSG399と接続し、pBCT4を得た(図2)。

【0053】

pdSBTでプレビバクテリウム・ラクトファーマメンタムAJ12036を形質転換し、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含むCM2Sプレート上を用いて形質転換体を選択した。形質転換は、電気パルス法(特開平2-207791号参照)により行った。取得した形質転換体を、AJ12036/pTSBTと命名した。AJ12036/pTSBT株をカナマイシン25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むM-CM2Sプレートに、プレートあたり $10^3 \sim 10^5 \text{cfu}$ 程度になるように希釈して塗布した。このプレートを34℃にて一晚培養した後、薬剤耐性を示す株を染色体プラスミドが組み込まれた株として取得した。得られた株について、相同組換えにより宿主染色体のptsIIIsuc遺伝子の中にベクタープラスミドが組み込まれていることを、PCRにより確認した。この組み込み株をYdS1と命名した。

【0054】

YdS1株について、糖源をグルコース又はシュークロースとする最少培地(グルコースまたはシュークロース20g/L、硫酸アンモニウム5g/L、尿素2g/L、 KH_2PO_4 1g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L、 FeSO_4 0.002g/dl、 MnSO_4 0.002g/dl、ビオチン100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、ビタミン B_1 2000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、DL-メチオニン10mg/dl、寒天15g/L、pH6.6)にて34℃にて培養した。結果を表3に示す。YdS1株は、グルコースのみを炭素源とする最少培地では生育できるが、シュークロースのみを炭素源とする最少培地では生育不可能であったことから、ptsIIIsuc遺伝子は、シュークロース取り込みにおいてシュークロース特異的な蛋白であるエンザイムIIをコードする遺伝子であると確認された。

【0055】

【表3】

表3 最少培地上での生育

菌株

炭素源

シュークロース グルコース

AJ12036	可	可
YdS1	不可	可

【0056】

【発明の効果】

本発明により、コリネ型細菌のシュークロースPTSエンザイムIIをコードする遺伝子、及びシュークロースPTSが機能しないコリネ型細菌の菌株が提供される。これらの遺伝子及び菌株は、糖の取り込み速度やアミノ酸及び核酸等の生産性が向上した菌株の育種等に利用することができる。

【0057】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

【0058】

<120> シュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNA

<130> P-6376

<141> 1999-07-02

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0059】

<210> 1

<211> 5969

<212> DNA

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<220>

<221> CDS

<222> (3779)..(5761)

<400> 1

agtcgcga cgccaccatt gatgtggtgg tcaccgagct tgcggaggct ttctacatct 60
 acgctcccgt cggcgtggag tggggtcatt acgggtggga tcacgccggt gaaagttgcg 120
 gaacccatgg tgttccttgt gggttgaggg aacgagtgcg ggtgagaagt ttttcaagt 180
 tctgcagttt ttaagttatg catcatcagc ttggaaggct gaggtaatc agtagacctg 240
 caacagcagg cctcaagtcc gaagataatt aacctagatc cgtagacata agacatcata 300
 cgtcctatgc ttgctggaag gaaccaaata acctagaaa gatggcagaa gtggtgcatt 360
 atcaagaaaa tgcagggtcaa gcagttaaaa aaattgaggg aagaattgtt cccccctcg 420
 ggggtattga tggctttctc caactcgaag acggcatcat cacggaactc tctggagaac 480
 cagcacctaa aaacgcagga ttccaccccg aactccccac gattgttccc ggttttattg 540
 atcttcataa tcacggtgga aacggtggcg cgtttcctac gggaacgcag gaccaggcga 600
 ggaacaccgc gcagtatcac cgcgaacatg gcacgaccgt gatgttgcca agcatggttt 660
 cggcgccggc tgacgcactg gcagcgcagg tggaaaacct tattcccttg tgtgaagagg 720
 tcctgctgtg cggcattcac ctcgagggcc ctttcatcaa cgcattgccg tgtggtgctc 780
 aaaacccgga ttctattttt cccggcaacc caacagatct tgcccgggtg atccatgcgg 840
 gaaaagggtg gatcaaatcg atcacagtag cgcgggaaac tgacaatctt tctgagcttc 900
 tcgatctctg cgcagcgcac cacatcattg cttccttcgg gcacactgat gcagattttg 960
 ataccactac cagcgcgaatt gccttggtta aagagaaaaa tgtgacggtc acggctacgc 1020
 atttgttcaa tgcgatgcct ccgctgcac atagggtccc cggcagcgtg ggcgctttgc 1080
 ttgctgcggc acgtgccggg gacgeatag ttgagttgat cgecgagggc gtgcatttgg 1140
 ccgatggaac ggtcgatcta gctcgttcca acaacgcctt ttctatcacg gacgccatgg 1200

aagccgccgg aatgccagac ggtgagtaca ttttgggcgt tttgaacgtc accgtcaccg 1260
atggagtcgc ccgtctgcgc gatggcggcg ccatcgccgg gggcaccagc aactagcga 1320
gtcagttcgt gcaccacgtg cgcaggggta tgacgcttat cgacgcgacc ctccacacct 1380
caaccgtcgc cgctaaaatt ctcggtcttg gcgatcacga aatcgctaaa tccaaccctg 1440
caaattttgt ggtctttgac tcaaacggcc aggtgcaaaa ggtccattta ggtcatcaag 1500
tactttaagt acgagtaaaa ctatcctgat tttaaaggag tcccaccatg gaaatcacta 1560
tctgcaaaga cgagcaagaa gtcggcaaag cagttgcagt cctaatcgca cccttcgcca 1620
acaagggtgg aaccttgggg ctgcaacag gatcctcacc actgagtacc taccaagagc 1680
tcattcgcgt gtatgaagct ggggaagtgt cattcaagaa ctgcaaggca ttcttgttgg 1740
atgaatacgt gggactaacc cgtgacgatg aaaacagcta ctttaaaacc attcgcaaag 1800
agttcactga ccacatcgac atcgttgatg aagaggtcta cagcccagat ggtgcaaacc 1860
ctgatccata cgaagcagct gcagagtatg aggcaaagat cgctgcagaa tccgttgaag 1920
ttcaaatect tggcatcggc ggaaacggca catcgcttcc attgaacct catcttctct 1980
gtcaggactg acaaaggtcc aggcgtgca ccctaaaact gtggaggaca acgctcgatt 2040
cttcaacacc atcgaagagg tccaaccca cgccgtcacc cagggtttgg gcactttgtc 2100
ccgcgcgcaa aacatcgtgt tgggtgcaac tggtaagga aaagccgacg ccatccgagg 2160
aactgtggaa ggcccagtgat ctgcttcttg ccaggttcc atcctgtaga tgcacaacat 2220
gccaccatca tcgttggatg aagcagcagt atccaagctg gaaaacgctg atcactaccg 2280
tctcatggag caattaaagc tgcgctagaa acaaaaagga aagtactgtg tggggctatg 2340
cacacagaac tttccagttt gcgcccgtcg taccatgtga ctctccgca gggcaggctc 2400
aatgatccca acggaatgta cgtcgatgga gataccctcc acgtctacta ccagcacgat 2460
ccaggtttcc ctttcgcacc aaagcgcacc ggctgggctc acaccaccac gccgttgacc 2520
ggaccgcagc gattgcagtg gacgcacctg ccgacgctc tttaccgga tgcacctat 2580
gacctggatg gatgctattc cgggtggagcc gtatttactg acggcacact taaacttttc 2640
tacaccggca acctaaaaat tgacggaaag cgccgcgcca ccaaaaacct tgtcgaagtc 2700
gaggacccaa ctgggctgat gggcggcatt catcgccgtt cgcttaaaaa tccgcttacc 2760
gacggacccg ccagcggttt cacaccccat taccgcgatc ccatgatcag cctgatggt 2820
~~gatggttga acatggttct tggggcccaa cgcgaaaacc tcaccgggtc agcggttcta 2880~~
taccgctcga cagatcttga aaactgggaa ttctccggtg aaatcacctt tgacctcagt 2940

gatgcacaac ctggttctgc tctgatctc gttcccgatg gctacatgtg ggaatgcccc 3000
 aaccttttta cgcttcgcga tgaagaaact ggcaagatc tcgacgtgct gattttctgt 3060
 ccacaaggat tggaccgaat ccacgatgag gttactcact acgcaagctc tgaccagtgc 3120
 ggatatgtcg tcgacaagct tgaaggaacg acctccgcg tcttgcgagg attcagcgag 3180
 ctggatttcg gccatgaatt ctacgcaccg caggttgcag taaacggttc tgatgcctgg 3240
 ctctgtgggct ggatggggct gcccgcgcag gatgatcacc caacagttgc acaggaagga 3300
 tgggtgcact gcctgactgt gcccgcgaag cttcatttgc gcaaccacgc gatctaccaa 3360
 gagctccttc tcccagaggg ggagtcgggg gtaatcagat ctgtattagg ttctgaacct 3420
 gtccgagtag acatccgagg caatatttcc ctcgagtggg atggtgtccg tttgtctgtg 3480
 gatcgtgatg gtgatcgtcg cgtagctgag gtaaaacctg gcgaattagt gatcgcgac 3540
 gataatacag ccattgagat aactgcaggt gatggacagg tttcattcgc ttttccgggc 3600
 cttcaaaggt gacactattg agagataagt catataaaag ggtcttttgt ggcaattgt 3660
 acaaatactt cgcaaaatcc ctgatcga cacaataaaa caggtttaat attgttttagc 3720
 ttttgaacaa acattcatgt ctgaatattt ttgtttcttc ccggttaagg agaaattc 3778
 atg gac cat aag gac ctc gcg caa cgc atc ctg cgc gac att ggc ggc 3826
 Met Asp His Lys Asp Leu Ala Gln Arg Ile Leu Arg Asp Ile Gly Gly
 1 5 10 15
 gaa gac aac att gtc gcc gcc gca cac tgt gca acg cgt tta cgc ctc 3874
 Glu Asp Asn Ile Val Ala Ala Ala His Cys Ala Thr Arg Leu Arg Leu
 20 25 30
 gtg ctc aaa gac acc aag gat gtg gat cgc caa agt ctg gat gat gat 3922
 Val Leu Lys Asp Thr Lys Asp Val Asp Arg Gln Ser Leu Asp Asp Asp
 35 40 45
 cca gat ctg aaa ggc acc ttt gaa act ggc ggc atg ttc cag atc atc 3970
 Pro Asp Leu Lys Gly Thr Phe Glu Thr Gly Gly Met Phe Gln Ile Ile
 50 55 60
 gtc ggg cca ggc gat gtg gat cat gtt ttc aaa gaa ctc gat gac gca 4018
 Val Gly Pro Gly Asp Val Asp His Val Phe Lys Glu Leu Asp Asp Ala
 65 70 75 80

acc tcc aaa gac atc gct gtg tcc aca gag cag ctc aaa gat gtt gtg 4066
Thr Ser Lys Asp Ile Ala Val Ser Thr Glu Gln Leu Lys Asp Val Val

85

90

95

gct aac aac gcc aac tgg ttc agc cgt gct gtg aag gta ttg gcg gac 4114
Ala Asn Asn Ala Asn Trp Phe Ser Arg Ala Val Lys Val Leu Ala Asp

100

105

110

att ttc gtc ccg ctg att cca atc ttg gtt ggt ggc ggt ctg ctc atg 4162
Ile Phe Val Pro Leu Ile Pro Ile Leu Val Gly Gly Gly Leu Leu Met

115

120

125

gct atc aac aat gtg ttg gtt gcg cag gat ctg ttc ggt ccg caa tca 4210
Ala Ile Asn Asn Val Leu Val Ala Gln Asp Leu Phe Gly Pro Gln Ser

130

135

140

ctg gtg gag atg ttc cct cag atc agc ggt gtt gct gag atg atc aac 4258
Leu Val Glu Met Phe Pro Gln Ile Ser Gly Val Ala Glu Met Ile Asn

145

150

155

160

ctg atg gca tct gcg ccg ttc gcg ttc ttg cca gtg ttg gtt ggt ttc 4306
Leu Met Ala Ser Ala Pro Phe Ala Phe Leu Pro Val Leu Val Gly Phe

165

170

175

acc gca acc aag cgt ttc ggt ggc aat gag ttc ctg ggc gcc ggc att 4354
Thr Ala Thr Lys Arg Phe Gly Gly Asn Glu Phe Leu Gly Ala Gly Ile

180

185

190

ggt atg gcg atg gtg ttc cca acc ctg gtt aac ggc tac gac gtg gcc 4402
Gly Met Ala Met Val Phe Pro Thr Leu Val Asn Gly Tyr Asp Val Ala

195

200

205

gcc acc atg acc gcg ggc gaa atg cca atg tgg tcc ctg ttt ggt ttg 4450
Ala Thr Met Thr Ala Gly Glu Met Pro Met Trp Ser Leu Phe Gly Leu

210

215

220

~~gat gtt gct caa gct ggt tac cag ggc acc gtg ctt cct gtg ctg gtg 4498~~

Asp Val Ala Gln Ala Gly Tyr Gln Gly Thr Val Leu Pro Val Leu Val

225	230	235	240	
gtc tct tgg att ctg gca acg atc gag aag ttc ctg cac aag cga ctc				4546
Val Ser Trp Ile Leu Ala Thr Ile Glu Lys Phe Leu His Lys Arg Leu				
245	250	255		
atg ggc act gca gac ttc ctg atc acc cca gtg ttg act ctg ctg ctc				4594
Met Gly Thr Ala Asp Phe Leu Ile Thr Pro Val Leu Thr Leu Leu Leu				
260	265	270		
acc ggc ttc ctt acg ttc att gct att ggt cca gca atg cgc tgg gtg				4642
Thr Gly Phe Leu Thr Phe Ile Ala Ile Gly Pro Ala Met Arg Trp Val				
275	280	285		
ggt gac ttg ctg gca cac ggt ctg cag gga ctc tat gat ttc ggt ggt				4690
Gly Asp Leu Leu Ala His Gly Leu Gln Gly Leu Tyr Asp Phe Gly Gly				
290	295	300		
cca gtc ggc ggt ctg ctt ttc ggt ctg gtc tac tca cca atc gtt atc				4738
Pro Val Gly Gly Leu Leu Phe Gly Leu Val Tyr Ser Pro Ile Val Ile				
305	310	315	320	
act ggt ctg cac cag tcc ttc ccg cca att gag ctg gag ctg ttc aac				4786
Thr Gly Leu His Gln Ser Phe Pro Pro Ile Glu Leu Glu Leu Phe Asn				
325	330	335		
cag ggt gga tcc ttc atc ttc gca acc gca tcc atg gcc aat atc gcg				4834
Gln Gly Gly Ser Phe Ile Phe Ala Thr Ala Ser Met Ala Asn Ile Ala				
340	345	350		
cag ggt gca gca tgt ttg gca gtg ttc ttc cta gcg aag agt gaa aag				4882
Gln Gly Ala Ala Cys Leu Ala Val Phe Phe Leu Ala Lys Ser Glu Lys				
355	360	365		
ctc aag ggc ctt gca ggt gct tca ggt gtc tcc gct gtt ctt ggt att				4930
Leu Lys Gly Leu Ala Gly Ala Ser Gly Val Ser Ala Val Leu Gly Ile				
370	375	380		
aca gag cct gcg atc ttc ggt gtg aac ctt cgc ctg cgc tgg ccg ttc				4978

Thr Glu Pro Ala Ile Phe Gly Val Asn Leu Arg Leu Arg Trp Pro Phe
 385 390 395 400
 tac att ggt atc ggt acc gca gct atc ggt ggc gct ttg att gca ctc 5026
 Tyr Ile Gly Ile Gly Thr Ala Ala Ile Gly Gly Ala Leu Ile Ala Leu
 405 410 415
 ttt gat atc aag gca gtt gcg ttg ggc gct gca ggt ttc ttg ggt gtt 5074
 Phe Asp Ile Lys Ala Val Ala Leu Gly Ala Ala Gly Phe Leu Gly Val
 420 425 430
 gtt tct att gat gct cca gat atg gtc atg ttc ttg gtt tgc gcg gta 5122
 Val Ser Ile Asp Ala Pro Asp Met Val Met Phe Leu Val Cys Ala Val
 435 440 445
 gtt acc ttt gtc atc gca ttc ggc gca gcg att gct tat ggc ctt tac 5170
 Val Thr Phe Val Ile Ala Phe Gly Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Tyr
 450 455 460
 ttg gtt cgc cgc aac ggc agc att gat cca gat gca acc gct gct cca 5218
 Leu Val Arg Arg Asn Gly Ser Ile Asp Pro Asp Ala Thr Ala Ala Pro
 465 470 475 480
 gtg cct gca gga acg acc aaa gcc gaa gca gaa gca ccc gca gaa ttt 5266
 Val Pro Ala Gly Thr Thr Lys Ala Glu Ala Glu Ala Pro Ala Glu Phe
 485 490 495
 tca aac gat tcc acc atc atc cag gca cct ttg acc ggt gaa gct atc 5314
 Ser Asn Asp Ser Thr Ile Ile Gln Ala Pro Leu Thr Gly Glu Ala Ile
 500 505 510
 gca ctg agc agc gtc agc gat gcc atg ttt gcc agc gga aag ctt ggc 5362
 Ala Leu Ser Ser Val Ser Asp Ala Met Phe Ala Ser Gly Lys Leu Gly
 515 520 525
 tca ggt gtt gcg atc gtc ccc acc aag ggg cag ctg gtt tca cca gtg 5410
 Ser Gly Val Ala Ile Val Pro Thr Lys Gly Gln Leu Val Ser Pro Val

agc gga aag atc gtg gtg gcc ttc cca tct ggt cac gct ttc gca gtc 5458
 Ser Gly Lys Ile Val Val Ala Phe Pro Ser Gly His Ala Phe Ala Val
 545 550 555 560
 cgc act aag gct gag gat ggt tcc aat gtg gat atc ttg atg cac att 5506
 Arg Thr Lys Ala Glu Asp Gly Ser Asn Val Asp Ile Leu Met His Ile
 565 570 575
 ggt ttc gac acc gta aac ctc aac ggc acg cac ttt aac ccg ctg aag 5554
 Gly Phe Asp Thr Val Asn Leu Asn Gly Thr His Phe Asn Pro Leu Lys
 580 585 590
 aag cag ggc gat gaa gtc aaa gca ggg gag ctg ctg tgt gaa ttc gat 5602
 Lys Gln Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Glu Leu Leu Cys Glu Phe Asp
 595 600 605
 att gat gcc att aag gct gca ggt tat gag gta acc acg ccg att gtt 5650
 Ile Asp Ala Ile Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Val Thr Thr Pro Ile Val
 610 615 620
 gtt tcg aat tac aag aaa acc gga cct gta aac act tac ggt ttg ggc 5698
 Val Ser Asn Tyr Lys Lys Thr Gly Pro Val Asn Thr Tyr Gly Leu Gly
 625 630 635 640
 gaa att gaa gcg gga gcc aac ctg ctc aac gtc gca aag aaa gaa gcg 5746
 Glu Ile Glu Ala Gly Ala Asn Leu Leu Asn Val Ala Lys Lys Glu Ala
 645 650 655
 gtg cca gca aca cca taagttgaaa ccttgagtgt tcgcacacag gttagactag 5801
 Val Pro Ala Thr Pro
 660
 ggacgtgac tctacgcatc ttgacaccg gtaccggtac gcttcgagat tttaaaccctg 5861
 ttcaaccagg tcatgcctcg gtgtacctgt gtggtgccac cccgcaatct tcacccca 5921
 ttggacatgt tcgttcagca gtagcgtttg atattttgcg ccgctgaa 5969

[0060]

<211> 661

<212> PRT

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 2

Met Asp His Lys Asp Leu Ala Gln Arg Ile Leu Arg Asp Ile Gly Gly

1 5 10 15

Glu Asp Asn Ile Val Ala Ala Ala His Cys Ala Thr Arg Leu Arg Leu

20 25 30

Val Leu Lys Asp Thr Lys Asp Val Asp Arg Gln Ser Leu Asp Asp Asp

35 40 45

Pro Asp Leu Lys Gly Thr Phe Glu Thr Gly Gly Met Phe Gln Ile Ile

50 55 60

Val Gly Pro Gly Asp Val Asp His Val Phe Lys Glu Leu Asp Asp Ala

65 70 75 80

Thr Ser Lys Asp Ile Ala Val Ser Thr Glu Gln Leu Lys Asp Val Val

85 90 95

Ala Asn Asn Ala Asn Trp Phe Ser Arg Ala Val Lys Val Leu Ala Asp

100 105 110

Ile Phe Val Pro Leu Ile Pro Ile Leu Val Gly Gly Gly Leu Leu Met

115 120 125

Ala Ile Asn Asn Val Leu Val Ala Gln Asp Leu Phe Gly Pro Gln Ser

130 135 140

Leu Val Glu Met Phe Pro Gln Ile Ser Gly Val Ala Glu Met Ile Asn

145 150 155 160

Leu Met Ala Ser Ala Pro Phe Ala Phe Leu Pro Val Leu Val Gly Phe

165 170 175

Thr Ala Thr Lys Arg Phe Gly Gly Asn Glu Phe Leu Gly Ala Gly Ile

180 185 190

Gly Met Ala Met Val Phe Pro Thr Leu Val Asn Gly Tyr Asp Val Ala

195

200

205

Ala Thr Met Thr Ala Gly Glu Met Pro Met Trp Ser Leu Phe Gly Leu

210

215

220

Asp Val Ala Gln Ala Gly Tyr Gln Gly Thr Val Leu Pro Val Leu Val

225

230

235

240

Val Ser Trp Ile Leu Ala Thr Ile Glu Lys Phe Leu His Lys Arg Leu

245

250

255

Met Gly Thr Ala Asp Phe Leu Ile Thr Pro Val Leu Thr Leu Leu Leu

260

265

270

Thr Gly Phe Leu Thr Phe Ile Ala Ile Gly Pro Ala Met Arg Trp Val

275

280

285

Gly Asp Leu Leu Ala His Gly Leu Gln Gly Leu Tyr Asp Phe Gly Gly

290

295

300

Pro Val Gly Gly Leu Leu Phe Gly Leu Val Tyr Ser Pro Ile Val Ile

305

310

315

320

Thr Gly Leu His Gln Ser Phe Pro Pro Ile Glu Leu Glu Leu Phe Asn

325

330

335

Gln Gly Gly Ser Phe Ile Phe Ala Thr Ala Ser Met Ala Asn Ile Ala

340

345

350

Gln Gly Ala Ala Cys Leu Ala Val Phe Phe Leu Ala Lys Ser Glu Lys

355

360

365

Leu Lys Gly Leu Ala Gly Ala Ser Gly Val Ser Ala Val Leu Gly Ile

370

375

380

Thr Glu Pro Ala Ile Phe Gly Val Asn Leu Arg Leu Arg Trp Pro Phe

385

390

395

400

Tyr Ile Gly Ile Gly Thr Ala Ala Ile Gly Gly Ala Leu Ile Ala Leu

405

410

415

Phe Asp Ile Lys Ala Val Ala Leu Gly Ala Ala Gly Phe Leu Gly Val

420	425	430	
Val Ser Ile Asp Ala Pro Asp Met Val Met Phe Leu Val Cys Ala Val			
435	440	445	
Val Thr Phe Val Ile Ala Phe Gly Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Tyr			
450	455	460	
Leu Val Arg Arg Asn Gly Ser Ile Asp Pro Asp Ala Thr Ala Ala Pro			
465	470	475	480
Val Pro Ala Gly Thr Thr Lys Ala Glu Ala Glu Ala Pro Ala Glu Phe			
485	490	495	
Ser Asn Asp Ser Thr Ile Ile Gln Ala Pro Leu Thr Gly Glu Ala Ile			
500	505	510	
Ala Leu Ser Ser Val Ser Asp Ala Met Phe Ala Ser Gly Lys Leu Gly			
515	520	525	
Ser Gly Val Ala Ile Val Pro Thr Lys Gly Gln Leu Val Ser Pro Val			
530	535	540	
Ser Gly Lys Ile Val Val Ala Phe Pro Ser Gly His Ala Phe Ala Val			
545	550	555	560
Arg Thr Lys Ala Glu Asp Gly Ser Asn Val Asp Ile Leu Met His Ile			
565	570	575	
Gly Phe Asp Thr Val Asn Leu Asn Gly Thr His Phe Asn Pro Leu Lys			
580	585	590	
Lys Gln Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Glu Leu Leu Cys Glu Phe Asp			
595	600	605	
Ile Asp Ala Ile Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Val Thr Thr Pro Ile Val			
610	615	620	
Val Ser Asn Tyr Lys Lys Thr Gly Pro Val Asn Thr Tyr Gly Leu Gly			
625	630	635	640
Glu Ile Glu Ala Gly Ala Asn Leu Leu Asn Val Ala Lys Lys Glu Ala			
645	650	655	

Val Pro Ala Thr Pro

660

[0061]

<210> 3

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Sau3AI cassette

<220>

<221> misc_feature

<222> (44)

<223> complementary strand extends a single strand having
a sequence of 3'-ctag-5' at this position in the
direction of 5' from 3'

<400> 3

gtacatattg tcgtagaac gcgtaatagc actcactata ggga

44

[0062]

<210> 4

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

~~<223> Description of Artificial Sequence: EcoRI cassette~~

<220>

<221> misc_feature

<222> (47)

<223> complementary strand extends a single strand having
a sequence of 3'-ttaa-5' at this position in the
direction of 5' from 3'

<400> 4

gtacatattg tcgtagaac gcgtaatacg actcactata gggagag

47

[0063]

<210> 5

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: HindIII cassette

<220>

<221> misc_feature

<222> (46)

<223> complementary strand extends a single strand having
a sequence of 3'-tcga-5' at this position in the
direction of 5' from 3'

<400> 5

gtacatattg tcgtagaac gcgtaatacg actcactata gggaga

46

[0064]

<210> 6

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PstI cassette

<220>

<221> misc_feature

<222> (48)..(51)

<223> complementary strand does not exist

<400> 6

gtacatattg tcgttagaac gcgtaatacg actcactata gggagactgc a

51

<210> 7

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Sall cassette

<220>

<221> misc_feature

<222> (47)

<223> complementary strand extends a single strand having
a sequence of 3'-agct-5' at this position in the
direction of 5' from 3'

<400> 7

gtacatattg tcgtagaac gcgtaatacg actcactata gggagag

47

[0065]

<210> 8

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: XbaI cassette

<220>

<221> misc_feature

<222> (47)

<223> complementary strand extends a single strand having
a sequence of 3'-gatc-5' at this position in the
direction of 5' from 3'

<400> 8

gtacatattg tcgtagaac gcgtaatacg actcactata gggagat

47

[0066]

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

~~<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR~~

<400> 9

25

cgctcttgcca ggattcagcg agctg

[0067]

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 10

25

agctggattt cggccatgaa ttcta

[0068]

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 11

23

gatctgttcg gtccgcaatc act

[0069]

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 12

cactggtgga gatgttcct cagat

25

[0070]

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 13

catcttcgca accgcatcca tggcc

25

[0071]

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 14

cgcgagggt gcagcatgtt tggc

24

~~[0072]~~

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 15

gggccttgca ggtgcttcag gtgtc

25

[0073]

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 16

ccgctgttct tggtattaca gagcc

25

[0074]

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 17

gcagcgtcag cgatgccatg ttg

25

[0075]

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 18

gcttggctca ggtgtgcga tcgtc

25

[0076]

<210> 19

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: cassette
primer 1

<400> 19

gtacatattg tcgttagaac gcggtaatat gactca

36

[0077]

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: cassette
primer 2

<400> 20

cgttagaacg cgtaatacga ctcactatag ggaga

35

[0078]

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 21

cgctactgct gaacgaacat gtcc

24

【図面の簡単な説明】

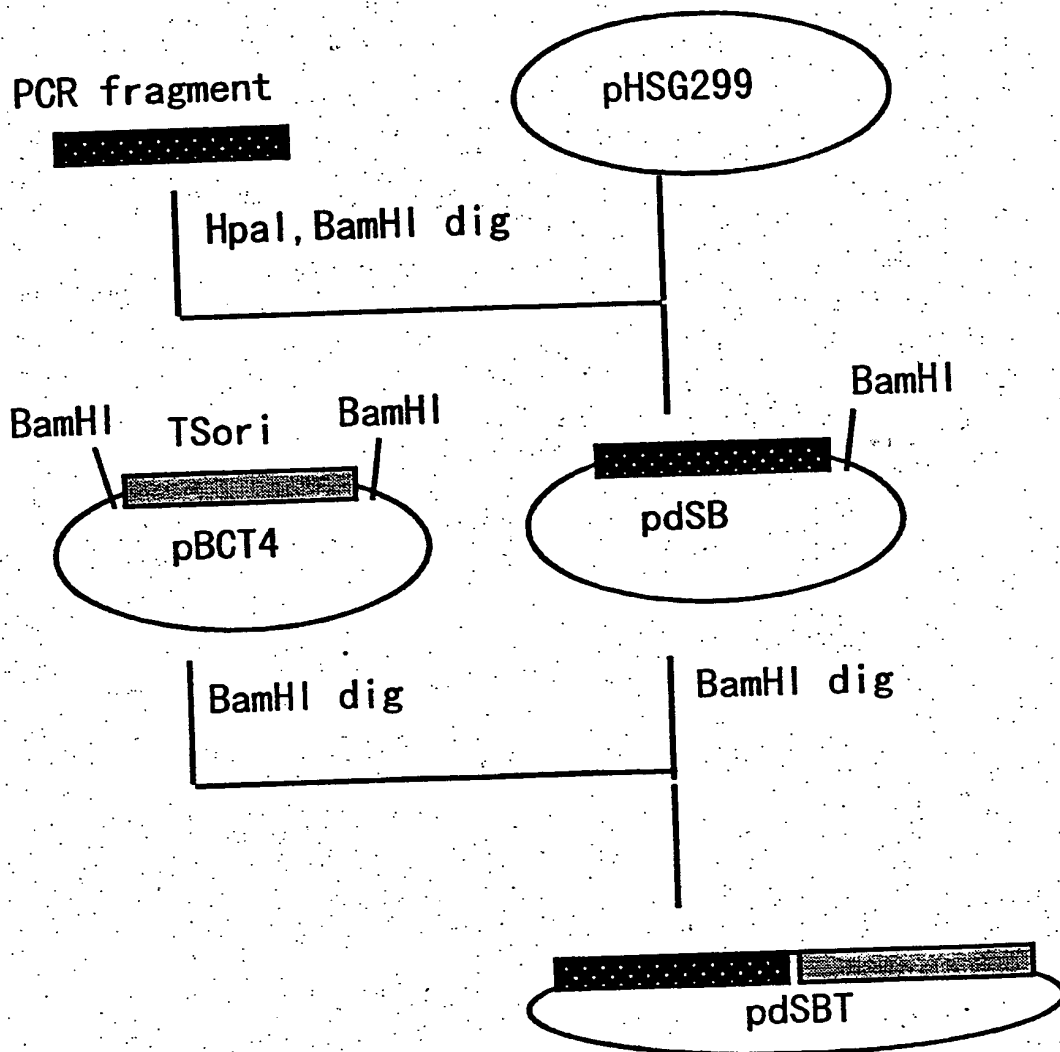
【図1】 シュークローズPTSエンザイムII遺伝子破壊用プラスミドの構築過程を示す図。

【図2】 pBCT4の構築過程を示す図。

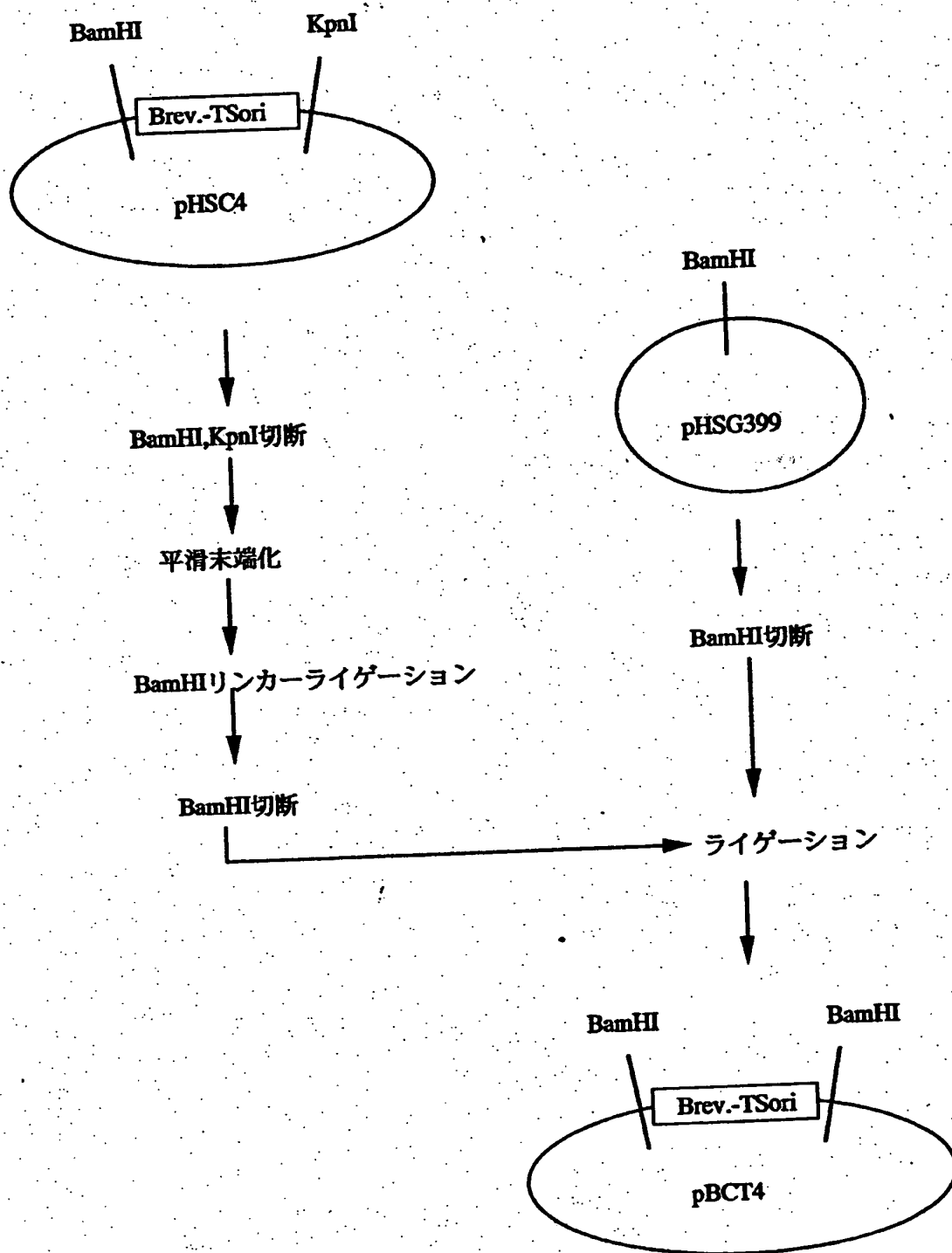
【書類名】

図面

【図1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コリネ型細菌のシュークロースPTSを構成するタンパク質をコードする遺伝子を提供する。

【解決手段】 コリネ型細菌のシュクラゼ遺伝子の下流領域をCassette-ligation mediated PCR法により増幅し、下記(A)又は(B)に示すタンパク質であるシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAを得る。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質。

【選択図】 図1

特平11-189512

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000066]

1. 変更年月日

1991年 7月 2日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名

味の素株式会社